

## АНОТАЦІЯ

*Гапон Г.О.* Структурно-функціональний стан поодиноких сперміїв людини після кріоконсервування. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії у галузі знань 09 – Біологія за спеціальністю 091 – Біологія – Інститут проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України, Харків, 2021.

Дисертаційна робота присвячена вирішенню проблеми ефективного кріоконсервування поодиноких сперматозоїдів людини при олігоастенотератозооспермії (ОАТ). У дисертаційній роботі теоретично обґрунтовано, методологічно визначено та статистично підтверджено вирішення актуального науково-практичного завдання кріобіології, а саме: наведено нові дані щодо впливу кріоконсервування з 10% розчином полівінілпіролідону (ПВП) у якості кріопротектору на ультраструктурні та морфофункціональні характеристики сперматозоїдів людини при ОАТ.

Після відтавання рухливими виявилися  $(78,8 \pm 6,6)\%$  сперматозоїдів, які були кріоконсервовані з 10% розчином гліцерину (група I) та  $(41,4 \pm 8,1)\%$  сперматозоїдів, кріоконсервованих з 10% розчином полівінілпіролідонем (ПВП) (група II). Свою життєздатність зберегли  $(92,1 \pm 8,6)\%$  та  $(89,6 \pm 8,6)\%$  сперматозоїдів груп I та II відповідно. Зразки групи I містили проникальний кріопротектор, який потребує видалення, тому ми повторно оцінювали рухливість клітин після подвійного центрифугування. Незважаючи на високу частоту виживання сперматозоїдів групи I, після центрифугування і видалення кріопротектору кількість рухливих сперматозоїдів зменшилася до  $(27,3 \pm 4,8)\%$ . Оскільки застосування непроникальних кріопротекторів не вимагає їх виведення, їх рухливість зберігалася на рівні нативних клітин (група III).

Морфологічний аналіз препаратів виявив, що частота аномалій голівки сперматозоїда склала  $25,97 \pm 2,67$ ,  $19,21 \pm 2,67$  та  $(20,57 \pm 1,19)\%$  для груп I–III відповідно. У групі I серед усіх можливих варіантів патології голівки більшу частину склали сперматозоїди з однією великою або декількома маленькими вакуолями. Частота аномалій шийки була незначною і склала  $13,04 \pm 0,98$ ,  $13,43 \pm 2,14$  та  $(13,26 \pm 1,61)\%$  для груп I–III відповідно. Різниця у кількості сперматозоїдів з патологією хвоста між групами була статистично незначуща ( $p > 0,05$ ). Сукупність дефектів голівки, шийки та середньої частини була значущо нижче у сперматозоїдах після кріоконсервування з ПВП ( $26,26 \pm 2,61\%$ ), порівняно з клітинами групи I – ( $35,73 \pm 3,59\%$ ). У нативних сперматозоїдах цей показник склав  $(24,88 \pm 2,44)\%$ .

Аналіз ультраструктурних аномалій з'ясував, що  $83,2 \pm 8,1$ ,  $63,2 \pm 5,1$  та  $(60,7 \pm 7,5)\%$  сперматозоїдів груп I–III мали аномалії голівки, шийки, хвоста або їхніх ультраструктурних елементів.

Не дивлячись на те, що за даними електронної мікроскопії хроматин сперматозоїдів усіх досліджуваних груп був щільно конденсований, у групах I–III спостерігалася тенденція до збільшення кількості сперматозоїдів із зміненою структурою ДНК (у групі III – кількість сперматозоїдів з неушкодженою ДНК склала  $(80,3 \pm 3,0\%)$ ). Після кріоконсервування в групі I кількість сперматозоїдів із фрагментацією ДНК склала  $38,8 \pm 3,0$ , у групі II –  $(23,1 \pm 2,5)\%$ . Значуще підвищення фрагментації ДНК у кріоконсервованих сперматозоїдах може бути пов'язано із окислювально-відновними процесами, які виникають у сперматозоїдах під час кріоконсервування.

Встановлено, що після кріоконсервування сперматозоїдів досліджувальних груп кількість клітин з високим мембранним потенціалом становила  $34,7 \pm 4,2$  та  $54,5 \pm 4,2$  та  $(74,9 \pm 3,8)\%$  для груп I– III відповідно. Таким чином, після кріоконсервування сперматозоїдів з ПВП зберігається хоча і значущо більша кількість клітин з високим мембранним потенціалом, ніж після кріоконсервування з гліцерином, але менша, ніж у контрольних

зразках. Це можна пояснити негативним впливом кріоконсервування на функціональну активність клітин. Водночас необхідно зазначити, що ПВП виступає як кріопротектор, використання якого призводить до збереження значущо більшої кількості сперматозоїдів у чоловіків з ОАТ, ніж найбільш поширений метод заморожування з гліцерином.

Було встановлено істотні відмінності у здатності сперматозоїдів досліджуваних груп пенетрувати *Zona pellucida* (ZP). Індекс і частота пенетрації ZP сперматозоїдами з нормозооспермічних еякулятів є значущо вищими, ніж при ОАТ. Фактори кріоконсервування не впливають на здатність сперматозоїдів зв'язуватися з ZP при нормозооспермії, однак призводять до її значущого зниження при ОАТ.

Морфокінетичний аналіз ембріонів виявив, що запліднення ооцитів сперматозоїдами, кріоконсервованими з 10% гліцерином призводить до зупинки розвитку на стадії 8-бластомерів більше 30% ембріонів. Такі ембріони характеризувались підвищеним рівнем фрагментації бластомерів, яка в окремих випадках сягала 100%. Частота блоку розвитку ембріонів на стадії 8-ми бластомерів, які були утворені після запліднення сперматозоїдами групи II, відповідала морфокінетичній картині групи III. Відповідно, частота формування бластоцист у групі I була значущо нижчою ( $30,9 \pm 3,3$ ), у порівнянні з даним показником для груп II ( $45,4 \pm 4,1$ ) та III ( $52,4 \pm 5,2$ )% ( $p < 0,01$ ).

Таким чином, використання ПВП у якості кріопротектору дозволило отримати високу частоту збереження морфофункціональних та ультраструктурних характеристик поодиноких сперматозоїдів людини при ОАТ.

Вперше показано ефективність кріоконсервування поодиноких сперматозоїдів людини з ПВП, оскільки морфологічні та ультраструктурні характеристики, стан ДНК, рівень збереженості мітохондріального

потенціалу, запліднювальна здатність та розвитку ембріонів *in vitro* відповідають таким при використанні свіжовиділених клітин .

Результати роботи можуть бути рекомендовані для використання в учбовому процесі в навчальних закладах для підготовки спеціалістів у різних галузях біології, зокрема кріобіології, ембріології, морфології, цитології та генетики.

**Ключові слова:** сперматозоїд, кріоконсервування, полівінілпіролідон, гліцерин, олігоастенотератозооспермія.

## ANNOTATION

### **Gapon G. A. Structural and functional state of single human sperm after cryopreservation. – The qualified scientific paper as a manuscript.**

Thesis for the degree of doctor of philosophy (Ph.D.) in specialty 091 Biology.  
– Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, 2021.

The thesis is dedicated to the development of methods of cryopreservation of human sperm with oligoasthenoteratozoospermia (OAT). The current scientific and practical problem of cryobiology is theoretically substantiated, methodologically defined and statistically confirmed: new data are obtained on the effect of cryopreservation with 10 % solution of polyvinylpyrrolidone (PVP) (m. w. 360000) as a cryoprotectant on ultrastructural and morphofunctional characteristics of human sperm with OAT.

After warming,  $78.8 \pm 6.6$  % of sperm cryopreserved with 10 % glycerol solution (group I) and  $41.4 \pm 8.1$  % of sperm cryopreserved with 10 % PVP solution (group II) were motile. The viability of sperm after warming was  $92.1 \pm 8.6$  % in group I and  $89.6 \pm 8.6$  % in group II. The samples of group I contained a permeable cryoprotectant that needed to be removed, thus the cell motility was re-evaluated after double centrifugation. Despite the high sperm viability in group I, the share of motile sperm decreased to  $27.3 \pm 4.8$  % after centrifugation and removal of the cryoprotectant. The use of non-penetrating cryoprotectants does not require their removal, hence the sperm motility remained same as that of the native cells (group III).

The preparations were analyzed morphologically. The frequency of abnormalities of the sperm head was  $25.97 \pm 2.67$ ,  $19.21 \pm 2.67$  and  $(20.57 \pm 1.19)$  % for groups I-III, respectively. In group I, the majority of variants of the sperm head pathologies were sperm with one large or several small vacuoles. The frequency of cervical abnormalities was insignificant and amounted to  $13.04 \pm 0.98$ ,  $13.43 \pm 2.14$  and  $(13.26 \pm 1.61)$ % for groups I-III, respectively. The difference in

the number of sperm with tail pathology was statistically insignificant. The sum of sperm defects was significantly lower in sperm after cryopreservation with PVP ( $26.26 \pm 2.61$ ) % compared with that in group I ( $35.73 \pm 3.59$ ) %. In native sperm, this figure was ( $24.88 \pm 2.44$ )%.

Analysis of ultrastructural abnormalities revealed that  $83.2 \pm 8.1$ ,  $63.2 \pm 5.1$  and ( $60.7 \pm 7.5$ )% of spermatozoa of groups I–III, respectively, had abnormalities of the head, mid piece, tail, or their ultrastructural elements.

According to electron microscopy, sperm chromatin of all studied groups was densely condensed. Despite that, the percentage of sperm with altered DNA structure tended to increase in groups I-III (in group III, the share of sperm with intact DNA was ( $80.3 \pm 3.0$ ) %). After cryopreservation, the share of sperm with DNA fragmentation was  $38.8 \pm 3.0$  % in group I and ( $23.1 \pm 2.5$ ) % in group II. A significant increase in DNA fragmentation in cryopreserved sperm may be associated with redox processes that occur in sperm during cryopreservation.

After cryopreservation, the number of sperm cells with high membrane potential was  $34.7 \pm 4.2$ ,  $54.5 \pm 4.2$ , and ( $74.9 \pm 3.8$ ) % for groups I – III, respectively. Thus, there are significantly more cells with high membrane potential after cryopreservation of sperm with PVP than after cryopreservation with glycerol, but less than in control samples. That can be explained by the negative impact of cryopreservation on the functional activity of cells. At the same time, it should be noted that PVP acts as a cryoprotectant, the use of which leads to the preservation of significantly more sperm in men with OAT than the most common method of freezing with glycerol.

We found significant differences in the ability of sperm of the studied groups to penetrate *Zona pellucida* (ZP). The index and frequency of ZP penetration by sperm from normozoospermic ejaculates are significantly higher than in OAT. Cryopreservation factors do not affect the ability of normozoospermic sperm to bind to ZP, but lead to a significant reduction in the case of OAT.

Morphokinetic analysis of embryos revealed that fertilization of oocytes with sperm cryopreserved with 10 % glycerol leads to the arrest of development of more than 30% of embryos at the 8 blastomeres stage. Such embryos were characterized by an increased level of blastomere fragmentation, which in some cases reached 100 %. The arrest rate of the 8 blastomeres stage embryos, which were formed after fertilization with sperm of group II, corresponded to the morphokinetics of group III. Accordingly, the blastocyst formation rate in group I was significantly lower ( $30.9 \pm 3.3$  %) compared with this parameter for group II ( $45.4 \pm 4.1$  %) and III ( $52.4 \pm 5.2\%$ ) ( $p < 0.01$ ).

Thus, the use of PVP as a cryoprotectant allowed to achieve a high level of preservation of morphological, functional and ultrastructural characteristics of single sperm of men with OAT.

The effectiveness of using PVP in cryopreservation of single sperm of men with OAT was shown for the first time based on the morphological and ultrastructural characteristics, DNA status, mitochondrial potential, fertilization and *in vitro* embryo development.

The results of the presented study can be recommended for use in the teaching process in educational institutions for the training of specialists in various fields of biology, including cryobiology, embryology, morphology, cytology and genetics.

**Key words:** cryopreservation, sperm, polyvinylpyrrolidone, glycerol, oligoasthenoteratozoospermia.

**СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ  
ТА ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ**  
**Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати**  
**дисертації**

Статті у фахових виданнях, у тому числі закордонних

1. **Гапон АА**, Волкова НО, Павлович ОВ. Стан деконденсації хроматину в сперміях людини після кріоконсервування та впливу електро-магнітного випромінювання в міліметровому діапазоні. Біофізичний вісник. 2013; 2:87–94.
2. **Гапон ГО**, Павлович ОВ, Ревенко О. Оптимізація режиму відтавання кріоконсервованої сперми людини при нормо- та патоспермії. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2016; 26(1):45–52.
3. **Гапон АА**, Павлович ЕВ, Петрушко МП, Юрчук ТА, Пиняев ВІ. Тест на пенетрацію с *Zona pellucida* как предиктор оплодотворяющей способности нативных и кріоконсервированных сперматозоидов человека. Український журнал медицини, біології та спорту. 2017;1:189–92.
4. **Гапон ГО**, Павлович ОВ, Юрчук ТО, Петрушко МП. Кріоконсервування сперматозоїдів людини з проникаючими і непроникаючими кріопротекторами. Медицина сьогодні і завтра. 2019; 4(85):27–34.
5. **Гапон ГО**, Петрушко МП, Павлович ОВ, Пуговкін АЮ, Коваленко ІФ, Пиняев ВІ, Юрчук ТО. Індукція вакуолізації в сперматозоїдах чоловіків з олгіастенотератозооспермією після кріоконсервування з гліцерином і полівнілпіролідом. Морфологія. 2020;14(3):148–53.
6. **Нарон Н**, Pavlovych O, Yurchuk T, Repin M, Marchenko L, Govorukha T, Petrushko M. Ultrastructural and Functional Characteristics of Human Spermatozoa After Cryopreservation by Vitrification. Probl Cryobiol Cryomed. 2020;30(1):24–33.



7. **Gapon A**, Yurchuk T, Petrushko M, Piniayev V, Kuleshova L. The impact of cryopreservation on the morphology of spermatozoa in men with oligoasthenoteratozoospermia. *Cryobiology*. 2021 Mar 2:S0011–2240(21)00059–6. doi: 10.1016/j.cryobiol.2021.02.009. Epub ahead of print. PMID: 33667435.

Статті у рецензованих виданнях України

8. **Гапон ГО**, Павлович ОВ, Юрчук ТО, Пиняєв ВІ, Петрушко МП. Кріоконсервування сперматозоїдів людини в ПВП і сахарози. *Експериментальна і клінічна медицина*. 2019;84(3):4–9.

Статті у збірниках наукових праць

9. **Гапон АА**, Петрушко МП, Пиняєв ВІ, Юрчук ТА, Павлович ЕВ. Выбор тактики оплодотворения ооцитов человека криоконсервированными сперматозоидами в программе лечения бесплодия вспомогательными репродуктивными технологиями. *Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Урологія, андрологія, нефрологія»*. 2016. С.152–4.
10. **Гапон АА**, Петрушко МП, Панасовский НЛ, Аркатов АВ, Павлович ЕВ, Юрчук ТА, Пиняєв ВІ. Эмбриологические параметры циклов лечения бесплодия методами ВРТ с использованием криоконсервированных эпидидимальных сперматозоидов. *Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Урологія, андрологія, нефрологія»*. 2017. С.106–8.
11. **Гапон ГО**, Петрушко МП, Юрчук ТО. Кріоконсервування сперматозоїдів людини при ОАТ. *Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Урологія, андрологія, нефрологія. Досягнення, проблеми, шляхи вирішення»*. Збірник наукових праць. Харків. 2019. С.147–8.

Патенти України на корисну модель

12. Патент України Патент № 144028. Україна, МПК А01N 1/02. Заявл. 27.03.2020, з.н. и 2020 02082. Публ. 25.08.2020. Бюл. № 16. Петрушко МП, Юрчук ТО, Гапон ГО, Павлович ОВ. Спосіб кріоконсервування сперматозоїдів чоловіків з вадами сперматогенезу.

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

13. Гапон АА, Волкова НА, Павлович ЕВ, Николов ОТ, Петрушко МП. Влияние факторов криоконсервирования на морфофункциональные характеристики спермы человека. Тезисы докладов научной конференции «Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины». Харьков, 18–19 октября 2012. Проблемы криобиологии. 2012;22(3):363.
14. Гапон АА, Павлович ЕВ, Петрушко МП, Юрчук ТА, Пиняев ВИ. Криоконсервирование единичных сперматозоидов путем витрификации в микросоломинках. Матеріали науково-практичної конференції з участю міжнародних спеціалістів, присвяченої дню науки «Медична наука на перетині спеціальностей: сьогодні і майбутнє» 19 травня 2017 р. С.84.
15. Gapon GO, Petrushko MP, Yurchuk TO, Pavlovich OV, Pinaev VI. Survival of Human Spermatozoa After Cryopreservation with No-Wash Procedure. Problems of Cryobiology and Cryomedicine. 2018;28(2):171.
16. Hapon HO, Pavlovich OV, Yurchuk TO, Repin MV, Marchenko LM. Ultrastructural Characteristics of Human Sperm After Cryopreservation with Polyvinylpyrrolidone by Vitrification. Problems of Cryobiology and Cryomedicine. 2019; 29(2):178.
17. Гапон ГО, Петрушко МП, Юрчук ТО. Кореляційний зв'язок стану ДНК та кінетичних характеристик сперматозоїдів людини під впливом факторів кріоконсервування методом вітрифікації. Матеріали

- конференції «Актуальні питання сучасної медицини» 28-29 березня 2019р. С.67–68.
18. **Гапон АА**, Петрушко МП, Павлович ОВ, Волкова НО, Пиняев ВИ, Юрчук ТА. Апоптоз в нативных и криоконсервированных сперматозоидах. Матеріали 5-го з'їзду клітинної біології з міжнародною участю. Одеса. 2-6 жовтня 2016. С. 12.
19. **Гапон ГО**, Павлович ОВ, Петрушко МП, Пиняев ВІ, Юрчук ТО. Morphological analysis of human spermatozoa at normozoospermia before and after cryopreservation. Матеріали Науково-практичної конференції з міжнародною участю «Теорія та практика сучасної морфології», м. Дніпро 5-7 жовтня 2016 р. Присвяченої 100-річчю дніпропетровської (Катеринославської) школи морфологів. С.27–28.
20. **Гапон АА**, Юрчук ТА, Петрушко МП, Павлович ЕВ, Пиняев ВИ. Пенетрационная активность нативных и криоконсервированных сперматозоидов человека. Матеріали міжнародної конференції «Холод в біології та медицині», Х., 2017, С.38.
21. **Gapon AA**, Petrushko MP, Yurchuk TA, Pavlovich EV, Pinyaev VI. Micro- and large volumes cryopreservation of single human spermatozoa using non-penetrating cryoprotectant. Society for Low Temperature Biology Annual Meeting 2018 6-7 September 2018, Crop Research Institute (Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.), Czech Republic. CryoLetters. 2019;40(5):257–74.
22. **Гапон ГО**, Петрушко МП, Юрчук ТО, Пиняев ВІ, Павлович ОВ. Вибір оптимального кріозахисного середовища для заморожування сперматозоїдів людини. Науково-практична конференція молодих вчених, присвячена 25-річчю НАМНУ. К., 23 березня Журнал Національної Академії Медичних Наук України. Спецвипуск. 2018 р. С.108–109.
23. **Гапон ГО**, Петрушко МП, Юрчук ТО, Павлович ОВ, Пиняев ВІ. Вплив сім'яної плазми на кінетичні характеристики та стан ДНК

- кріоконсервованих сперматозоїдів людини. Матеріали XV Міжнародної наукової конференції студентів, молодих вчених та фахівців «Актуальні питання сучасної медицини» до 213-річчя зі дня заснування та 25-річчя зі дня відродження медичного факультету Харківського національного університету В.Н. Каразіна, 25-26 квітня 2018 року. С.61–63.
24. **Гапон Г**, Yurchuk T, Pavlovich O, Petrushko M. DNA fragmentation of cryopreserved human sperm of men with pathospermia. *Biopolimers and cell.* 2019;35(5):399.
25. **Гапон Г**, Pavlovich O, Piniayev V, Yurchuk T, Petrushko M. Level of lipid peroxidation and antioxidant protection state in native and cryopreserved human spermatozoa. Матеріали XII Українського біохімічного конгресу, м.Тернопіль, 30 вересня-4 жовтня 2019. С.122
26. **Гапон ГО**, Юрчук ТО, Петрушко МП. Оцінка морфологічних характеристик сперматозоїдів людини для вибору метода запліднення ооцитів у програмах ДРТ. Науково-практична конференція з міжнародною участю «Актуальні проблеми морфології в теоретичній та практичній медицині». 24-25 жовтня 2019 року, м.Чернівці. С.44–6.
27. **Гапон ГО**, Павлович ОВ. Кріоконсервування сперматозоїдів людини з полівінілпіролідом за олігоастенотератозооспермії. *Проблеми кріобіології і кріомедицини.* 2020;30(3):296.
28. **Гапон ГО**, Павлович ОВ, Юрчук ТО, Піняєв ВІ, Петрушко МП. Стан хроматину в сперматозоїдах людини після кріоконсервування. Матеріали четвертої всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Теорія та практика сучасної морфології» 4-листопада 2020 р.; Дніпро. С.18.
29. **Гапон ГО**, Павлович ОВ, Юрчук ТО, Піняєв ВІ, Петрушко МП. Оцінка морфологічних параметрів сперматозоїдів, кріоконсервованих з ПВП. Матеріали XVII міжнародної науково-практичної конференції «Актуальні питання сучасної медицини». Харків, 2020. С.72–3.

30. **Gapon GO**, Petrushko MP, Pavlovich OV, Puhovkin AYц, Kovalenko IF, Pinyaev VI, Yurchuk TO. Induction of vacuolization in spermatozoa from men with oligoasthenoteratozoospermia after cryopreservation with glycerol and PVP матеріали четвертої всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Теорія та практика сучасної морфології» 4-6 листопада 2020 р; Дніпро, Україна с. 87–8.